

## REGULACION DE LA LUTEINIZACION FOLICULAR POR UN ANALOGO DE LA HORMONA LIBERADORA DE GONADOTROFINAS (GnRH)

CLAUDIA ANDREU, FERNANDA PARBORELL, SILVIA VANZULLI, MARTA TESONE

*Instituto de Biología y Medicina Experimental-CONICET-Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires*

**Resumen** Tratamientos prolongados con análogos de GnRH son utilizados en la clínica con el objeto de suprimir la secreción endógena de gonadotrofinas, sin embargo estos análogos ejercen un efecto directo sobre el ovario. El objetivo de este trabajo fue estudiar la acción del análogo de GnRH acetato de leuprolide (LA) sobre esteroidogénesis y apoptosis ovárica. Se inyectó LA (1 µg/rata/día) a ratas prepúberes superovuladas con PMSG/hCG. Se aislaron los cuerpo lúteos por microdissección y se incubaron durante 3 hs con LH (10 ng/ml) o dibutiril AMPc (dAMPc 1 mM). Se midió la progesterona producida observándose una disminución en el grupo LA tanto de la producción basal como en respuesta a LH (Basales = Control C: 96,6 ± 9,6; LA: 22,9 ± 2,8; LH= C: 145,7 ± 4,9; LA: 23,6 ± 2,0 ng/ml, p<0,001). En cambio el dAMPc estimuló significativamente en ambos casos (C: 153,9 ± 11,8; LA: 83,15 ± 8,2). El AMPc producido fue menor en cuerpos lúteos del grupo LA y no fue estimulado por LH (Basales= C: 7,29 ± 1,6; LA: 1,17 ± 0,6; LH = C: 13,2 ± 0,4; LA: 2,5 ± 0,4 ng/ml, p<0,01). El contenido proteico por cuerpo lúteo fue semejante en los dos grupos. Por otro lado, teniendo en cuenta que en cortes histológicos de ovarios de ratas tratadas con LA encontramos mayor cantidad de folículos atrésicos y menor de cuerpos lúteos, hemos determinado la cantidad de células apoptóticas. Se tomó como criterio la presencia de cuerpos apoptóticos y núcleo en medialuna, detectándose un número mayor en el grupo LA. Este resultado fue confirmado por inmunohistoquímica (TUNEL). Se concluye que LA produce en el ovario una falla en el sistema receptor de LH- adenilato ciclase y un aumento de la apoptosis celular.

**Palabras clave:** GnRH, ovario, esteroidogénesis, apoptosis

Los agonistas sintéticos de la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH-a) se utilizan frecuentemente en el tratamiento de la infertilidad humana. Estas moléculas reducen la secreción endógena de gonadotrofinas a través de un mecanismo de desensibilización hipofisaria. Se ad-

ministran, asociados a gonadotrofinas, en los ciclos de hiperestimulación ovárica a pacientes sometidas a fertilización asistida con el objetivo de inhibir el pico endógeno de LH y mejorar el reclutamiento folicular<sup>1,2</sup>. Sin embargo, cuando se administran análogos es necesario aumentar las dosis de gonadotrofinas (hMG) utilizadas para la hiperestimulación ovárica<sup>2</sup>. Esta menor sensibilidad a hMG es probablemente debido a un efecto directo de estos péptidos sobre el ovario.

Se ha demostrado que el GnRH y sus agonistas actúan en tejidos extrahipofisarios como placenta, mama y ovario<sup>1</sup>. En el ovario se

Recibido: 16-X-1996

Aceptado: 13-XI-1996

Correspondencia: Dra. Marta Tesone, Instituto de Biología y Medicina Experimental, Obligado 2490, 1428 Buenos Aires, Argentina

han identificado RNA mensajeros y receptores para GnRH<sup>3-8</sup>. La acción antagonista de los análogos de Gn-RH ha sido descripta en cultivos de células de granulosa y luteales de rata<sup>9,10</sup>. Trabajos recientes realizados en folículos ováricos de ratas tratadas con análogos de GnRH muestran que habría un aumento de la muerte por apoptosis o muerte celular programada en células foliculares<sup>11</sup>. En nuestro laboratorio hemos demostrado la acción inhibitoria de un análogo de GnRH (acetato de leuprolide) sobre los receptores de LH y la actividad de aromatasa en células de granulosa humana<sup>12</sup>.

El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de un análogo de GnRH, acetato de leuprolide, sobre la esteroidogénesis luteal y su relación con procesos apoptóticos.

Como modelo experimental se utilizaron ratas hembra (Sprague-Dawley) prepúberes (25 días) superovuladas con PMSG (25 UI/rata) y a las 48 hs con hCG (25 UI/rata). Simultáneamente con la inyección de PMSG se inició un tratamiento con acetato de leuprolide (1 µg/rata/día): grupo LA o vehículo: grupo C. Los animales se sacrificaron por decapitación luego de 7 días de tratamiento con LA y se realizaron los experimentos. Como excepción el análisis de células apoptóticas en folículos atrésicos se analizó luego de 24 o 48 hs de tratamiento. Se utilizaron 6 animales por grupo y los ensayos fueron repetidos al menos 2 veces. El tratamiento estadístico de los datos se realizó por análisis de varianza (ANOVA) y el test de múltiple rango de Scheffe, usando para ello el programa estadístico STATGRAPHICS (Statistical Graphics Corporation, STSC, Inc).

La progesterona sérica se midió por RIA luego de extracción con éter. Observándose una disminución significativa en el grupo LA (C: 79,81 ± 13,41 ng/ml; LA: 16,43 ± 1,81 ng/ml,  $p < 0,005$ ).

Se aislaron cuerpos luteos por microdissección y se incubaron (4 cuerpos luteos/0,5 ml) por triplicado 3 hs a 37° en Dulbecco's Modified Minimal Essential Medium-Ham F-12 (1:1) (con el agregado de Hepes 10 mM y BSA 0,1%), pH 7,4 (DMEM:F12). Las incubaciones se realizaron con el agregado o no de LH (hLH 10 ng/ml) o dibutil AMPc (dAMPc 1 mM). La progesterona y AMPc producido se midieron en los medios de incubación por RIA. Se observó una disminución de la producción de progesterona en el grupo LA tanto basal como en respuesta a LH (Fig. 1). En

cambio el dAMPc estimuló la producción de progesterona en ambos grupos (Fig. 1). El nivel de AMPc producido por cuerpos luteos fue menor en el grupo LA y no fue estimulado por LH (Fig 2). Con el objeto de determinar si los cambios observados se debían a una disminución general del contenido proteico en cuerpos luteos de ratas tratadas con LA se determinó su concentración luego de digestión con HONa 0,5 N. No hubo diferencias significativas entre ambos grupos (C: 62,51 ± 6,10 ng/ml; LA: 43,08 ± 5,02 ng/ml).

Por otro lado, considerando que en cortes histológicos de ovarios de ratas tratadas con LA encontramos mayor cantidad de folículos atrésicos y menor de cuerpos luteos<sup>13</sup>, hemos determinado la cantidad de células apoptóticas en ovarios de ambos grupos. La observación morfológica de apoptosis en folículos ováricos atrésicos y cuerpos luteos se realizó en cortes de ovarios teñidos con hematoxilina eosina. Las células ováricas (granulosa o luteales) se consideraron apoptóticas cuando presentaron reducción del volumen nuclear y colapso de la cromatina en medias lunas adheridas a la membrana nuclear, o núcleos picnóticos (colapso total del núcleo en una sola esfera densa), o fragmentación de las células en cuerpos apoptóticos (restos celulares

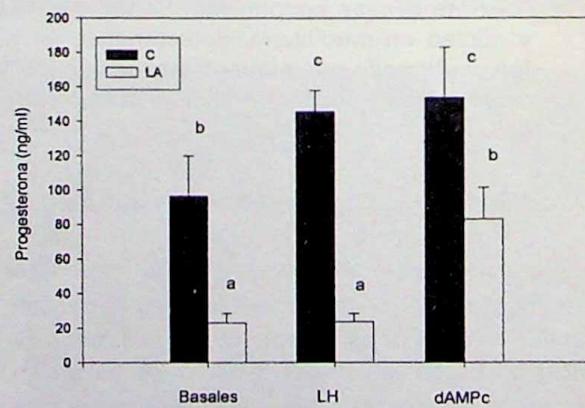


Fig. 1.- Producción de progesterona por cuerpos luteos aislados de ratas superovuladas controles C o tratadas con LA (1 mg/rata durante 7 días). Los cuerpos luteos (4/0,5 ml) fueron cultivados durante 3 hs con LH (hLH 100 ng/ml) o dibutil AMPc (dAMPc 1 mM). Los medios fueron congelados a -20°C hasta la determinación de progesterona por RIA. Los valores representan el promedio ± SEM de cuerpos luteos obtenidos de 6 ratas. (a vs c y vs b  $P < 0,001$ , c vs b  $P < 0,01$ ).

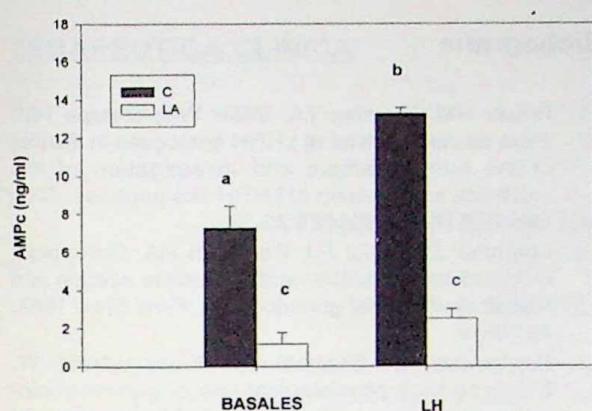


Fig 2: Producción de AMPc por cuerpos lúteos aislados de ratas superovuladas controles o tratadas con LA. Las condiciones fueron las mismas que las descriptas en la Fig 1. (a vs b  $P < 0,01$ , a vs c  $P < 0,001$ ).

rodeados de membrana plasmática) (Fig. 3). Se analizaron 70 cuerpos lúteos de 12 cortes histológicos correspondientes a ovarios de distintos animales. Se detectó un número mayor de células apoptóticas en el grupo LA ( $N^o$  de células apoptóticas/cuerpo lúteo= C:  $2,54 \pm 0,2$ ; LA:  $17,53 \pm 1,2$ ,  $P < 0,001$ ). Por otro lado se contó el número de células apoptóticas en folículos atrésicos luego de 24 y 48 hs de tratamiento con LA y hubo un aumento significativo en ambos casos. Adicionalmente estos resultados se confirmaron por inmunohistoquímica utilizando el kit comercial ApopTag Plus para apoptosis *in situ* (TUNEL) (datos no mostrados).

Estos resultados demuestran que el tratamiento con LA a ratas prepúberes superovuladas produce una disminución de la actividad esteroidogénica luteal. En trabajos previos<sup>12</sup> observamos que la adición de LA a cultivos de células luteales de rata produce una disminución de la cantidad de receptores a LH y de la producción *in vitro* de progesterona. Estudios *in vivo*<sup>14</sup> demuestran una regulación negativa de los receptores de LH luego de la administración de un análogo de GnRH. La falta de respuesta a LH en cuerpos lúteos de animales tratados con LA probablemente refleja esta falla a nivel del sistema de reconocimiento a LH y/o una alteración en el sistema de acople a la adenilato ciclase, ya la LH no es capaz de estimular la producción de AMPc. Sin embargo los eventos posteriores involucrados en la esteroidogénesis luteal se mantienen ya que los

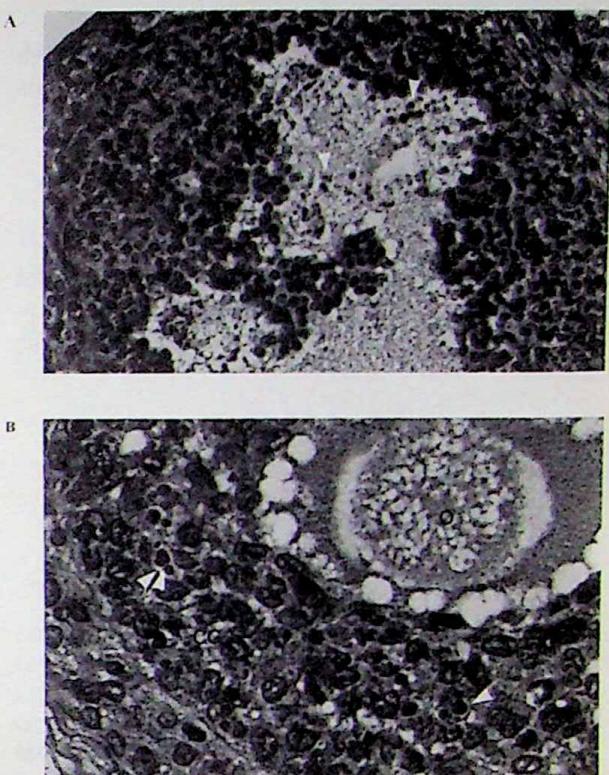


Fig.3: Microfotografías de cortes histológicos teñidos con hematoxilina eosina de ovarios de ratas superovuladas y tratadas 24 hs con LA.

PANEL A: Folículo atrésico. Aumento final: 400 x. Nótense los núcleos picnóticos de células ubicadas dentro de la cavidad antral (flechas blancas).

PANEL B Detalle a mayor aumento: 1000x. ( Flechas blancas: Cuerpos apoptóticos; CG: células de la granulosa; O: ovocito; T:células de la teca).

cuerpos lúteos son capaces de responder a la estimulación con dAMPc.

Trabajos previos<sup>11</sup> demuestran un aumento de muerte celular por apoptosis en folículos ováricos de ratas tratadas con un análogo de GnRH. En base a esto y a nuestros resultados acerca de la disminución de cuerpos lúteos y aumento de folículos atrésicos en ovarios de ratas tratadas con LA<sup>13</sup> estudiamos la presencia de células apoptóticas en folículos atrésicos a tiempos tempranos luego de la administración de LA (24 y 48 hs) observándose un aumento de este fenómeno. Adicionalmente observamos este aumento en cuerpos lúteos luego de 7 días de tratamiento. Estos resultados podrían indicar una alteración en el proceso de desarrollo folicular y luteinización. Se sugiere que el tratamiento con LA a ratas prepúberes superovuladas produce en

el ovario una falla en el sistema receptor de LH-adenilato ciclase y un aumento de la apoptosis celular.

## Agradecimientos

Este trabajo se llevó a cabo con subsidios de la UBA y CONICET. Agradecemos la colaboración del Dr. A. Molinolo y del Dr. O. Pignataro en la realización de este trabajo.

## Summary

### *Regulation of follicular luteinization by an agonist of gonadotropin-releasing hormone (GnRH)*

Long treatments with GnRH agonist are used in patients to suppress the endogenous secretion of gonadotropins, however; these analogs have a direct effect on the ovary. The aim of this work was to study the *in vivo* effect of the GnRH analogue, leuprolide acetate (LA) on ovarian steroidogenesis and apoptosis mechanisms. LA (1 µg/rat/day) was injected to PMSG/hCG superovulated rats. Corpora lutea were isolated by microdissection and incubated (4/0.5 ml) during 3 h with LH (10 ng/ml) or dibutyryl cAMP (dcAMP 1 mM). Progesterone production was measured observing in LA treated rats a decrease in basal and LH stimulated values (Basal = Control C: 96.6 ± 9.6; LA: 22.9 ± 2.8; LH= C: 145.7 ± 4.9; LA: 23.6 ± 2.0 ng/ml,  $p < 0.001$ ). In contrast, dcAMP stimulated significantly both groups (C: 153.9 ± 11.8; LA: 83.15 ± 8.2). cAMP production was lower in LA corpora lutea and LH was not able to stimulate them (Basal= C: 7.29 ± 1.6; LA: 1.17 ± 0.6; LH= C: 13.2 ± 0.4; LA: 2.5 ± 0.4 ng/ml,  $p < 0.01$ ). Corpus luteum of both groups showed similar protein content. On the other hand, taking into account that in ovarian histological slides of LA treated rats we observed more atresic follicles and less corpora lutea, we determined the amount of apoptotic cells. The criterion used was the presence of apoptotic bodies and nuclear chromatin aggregated in dense masses beneath the nuclear envelope. An increase of apoptotic cells in the LA group ovaries was detected. This result was confirmed by immunohistochemical technics (TUNEL). It was concluded that LA treatment produces in ovarian cells a failure in the LH receptor-adenilate cyclase system and an increase in cellular apoptosis.

## Bibliografía

- Fraser HM, Bramley TA, Miller WR, Sharpe RM. Extra pituitary actions of LHRH analogues in tissues of the human female and investigation of the existence and function of LHRH-like peptides. *Prog Clin Biol Res* 1986; 225:29-33.
- Lewinthal D, Taylor PJ, Pattinson HA, Coronblum B. Induction of ovulation with leuprolide acetate and human menopausal gonadotropin. *Fertil Steril* 1988; 49:585-8.
- Birnbaumer L, Shahabi N, Rivier J, Vale W. Evidence for a physiological role of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) or GnRH-like material in the ovary. *Endocrinology* 1985; 116: 1367-70.
- Goubaud S, Bond CT, Adelman JP, et al. Partial characterization of the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) gene transcript in the rat ovary. *Endocrinol* 1992; 130: 3098-100.
- Peng Ch, Fan NC, Ligier M, Vaananen J, Leung PCK. Expression and regulation of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor messenger ribonucleic acids in human granulosa-luteal cells. *Endocrinology* 1994; 135: 1740-6.
- Minaretzis D, Jakubowski M, Mortola JF, Pavlou SN. Gonadotropin-releasing hormone receptor gene expression in human ovary and granulosa-lutein cells. *Clin Endocrinol Metab* 1995; 80: 430-4.
- Whitelaw PF, Eidne KA, Sellar R, Smyth CD, Hillier SE. Gonadotropin-releasing hormone receptor messenger ribonucleic acid expression in the rat ovary. *Endocrinology* 1995; 136: 172-8.
- Séguin C, Pelletier G, Dubé D, Labrie F. Distribution of luteinizing hormone-releasing hormone receptors in the rat ovary. *Regul Pept* 1982; 4:183-8.
- Clayton RN, Harwood JP, Catt KJ. Gonadotropin-releasing hormone analogue binds to luteal cells and inhibits progesterone production. *Nature* 1979; 282: 90-2.
- Knecht M, Amsterdam A, Catt KJ. Inhibition of granulosa cell differentiation by gonadotropin-releasing hormone. *Endocrinology* 1982; 110: 865.
- Billig A, Furuta I, Hsueh AJW. Gonadotropin-releasing hormone directly induces apoptotic cell death in the rat ovary: biochemical and *in situ* detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in granulosa cells. *Endocrinology* 1994; 134: 245-52.
- Guerrero EH, Stein P, Asch RH, Polak de Fried E, Tesone M. Effect of a gonadotropin-releasing hormone agonist on luteinizing hormone receptors and steroidogenesis in ovarian cells. *Fertil Steril* 1993; 59: 803-9.
- Andreu CV, Verbitsky M, Stein P, Chemes H, Tesone M. Efecto del tratamiento con un análogo de la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH), acetato de leuprolide (LA), a ratas prepúberes superovuladas. *Medicina (Buenos Aires)* 1995; 55: 583.
- Séguin C, Blanger A, Cusan L, et al. Relative importance of the adenohypophyseal and gonadal sites of inhibitory action of LHRH agonists. *Biol Reprod* 1981, 24:889-901.